

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)

分担研究報告書

LKM-1抗体陽性患者のCYP2D6上のエピトープ解析:AIH 2aと2bの比較

研究協力者 西口修平 大阪市立大学肝胆膵病態内科学 助教授

研究要旨: 自己免疫性肝炎、C型慢性肝炎で検出される肝腎ミクロゾーム抗体(LKM-1抗体)のチトクロームP4502D6(CYP2D6)の認識部位についてAIH2aと2bについて比較した。さらに、フランスから供与されたAIH2の症例についても検討し、日仏の比較を行った。

共同研究者

小島典子 大阪市立大学肝胆膵病態内科学、
今岡 進、船江良彦 同生体機能解析学

A. 研究目的

Anti-liver-kidney microsome-1抗体(以下LKM-1抗体)はチトクロームP450の2D6分子種を対応抗原とする抗体であり、2型自己免疫性肝炎(以下AIH2a)の診断マーカーである。C型慢性肝炎(以下CHC)においても数%の症例に本抗体の陽性例が存在することが明らかとなっている(AIH2b)。しかしながら、LKM-1抗体陽性のCHCのうち、肝障害の原因としてHCVよりも自己免疫的な肝細胞障害を主体とする症例がどの程度含まれているのかは不明であり、臨床的な鑑別法も確立されていない。

我々はAIH2aと2bのそれぞれについてLKM-1抗体のCYP2D6活性に及ぼす影響や認識するエピトープの差異について検討を行ってきた。CYP2D6は人種による多型に富むことが報告されており、AIH2aの頻度も人種間で相違があると言われている。今回我々は日本よりも遙かにAIH2aの頻度が高いと言われているフランス人の血清を用いてLKM-1抗体のエピトープ部位をCYP2D6の全領域にわたって検索し、AIH2a 4例とAIH2b19例について日仏の比較検討を行った。

B. 研究方法

患者さんより同意を得た上で採血させて頂いたInternational Autoimmune Hepatitis score (1993)を満たすAIH16例、インターフェロン治療前のHCV-RNA陽性388例を対象とした。さらに今回は香川医科大学西岡幹夫教授、富山医科薬科大学渡辺明治教授、フランスのDr. Yamamotoより供与いただいたAIH2a2例、

AIH2b7例についてもあわせて検討した。

1) LKM-1抗体検出用ELISAキット(MBL社製)を使用し、上記患者血清の測定を行った。LKM-1抗体陽性となった患者血清についてさらに以下の方法で検討を行った。

2) ヒトCYP2D6 cDNAをPCR法によりクローニングし精製したCYP2D6をプロテアーゼにて切断し、逆相の液体クロマトグラフィーにて個々のペプチドを分取し、ELISAプレートにひいてLKM-1抗体陽性血清と反応させた。LKM-1抗体陽性血清は1)での抗体価により80倍から300倍に希釈し、2次抗体にはGoat anti-human IgGを1000倍希釈にて用いた。

3)2)にて高い反応性を示したペプチドについて、それぞれのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーにてN末端より決定した。

C. 研究結果

1) MBL社製のキットを用いた測定で、AIH16例中1例(6%)、CHC388例中6例(1.5%)にLKM-1抗体が検出された。

2) 精製ヒトCYP2D6を用いた検討ではAIH 2aの4例では全例でCYP2D6の1-146、181-214に相当するペプチドに対してELISA法で高い吸光度が認められた。また、4例中3例で256-281に反応が認められ、284-

表1. Reactivity for digested peptides by ELISA

Patients No.	HCV	Titers for CYP2D6 by ELISA					
		1-146	181-214	246-281	284-391	411-429	
1	-	137.6	Japanese	+	+	+	+
2	-	125.6	Japanese	+	+	+	+
3	-	186.9	French	+	+	+	
4	-	100.1	French	+	+		+
1	+	137.2	Japanese				+
2	+	116.5	Japanese				+
3	+	102.1	Japanese		+		+
4	+	97.4	Japanese		+		+
5	+	85.2	Japanese		+		+
6	+	70.7	Japanese				not reacted
7	+	69.9	Japanese				not reacted
8	+	63.5	Japanese				not reacted
9	+	56.1	Japanese				not reacted
10	+	45.1	Japanese				not reacted
11	+	143.7	French		+		+
12	+	143.3	French		+		+
13	+	94	French				not reacted
14	+	76.4	French				not reacted
15	+	72.2	French				not reacted
16	+	58.5	French		+		+
17	+	57.1	French				not reacted

391、411-429にもそれぞれ2例、1例が反応していた。一方、AIH2b17例についても同様の検討を行った。AIH2bではCYP2D6の181-214、284-391、411-429に数例ずつ反応しており、9例ではいずれのペプチドフラグメントとも反応が認められなかった。2aで全例に認められた1-146との反応は1例も認めなかった。また256-281に対する反応も認めなかった(表1)。

3) フランスより供与された血清(AIH 2a 2例、AIH 2b7例)と我が国の症例についてエピトープを比較した。その結果、日本の血清とフランスの血清の間には、CYP2D6の認識部位に明らかな違いは認めなかった。

今回の検討で、我々はリシルエンドペプチダーゼ処理後のペプチドフラグメントを用いてCYP2D6の全領域にわたってエピトープを決定する方法を確立し、日仏の血清を用いた検討を行った。今後、プロテアーゼの種類を変えていくことで更にエピトープを限定していくことが可能と考えられる。

D. 結論

リシルエンドペプチダーゼ処理後のペプチドフラグメントに対するLKM-1抗体の反応はAIH2aとAIH2bでは異なっていると考えられた。また、CYP2D6の1-146に相当するペプチドはAIH2aで特異的に認識される部位であると考えられ、AIH2aとAIH2bを識別する上でこの部位が重要であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Morikawa, K. Hachiya, S. Nishiguchi, et al. Sublobular veins as the main site of lymphocyte adhesion/transmigration and adhesion molecule expression in the porto-sinusoidal-hepatic venous system during concanavalin A-Induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2000; 31: 83-94.
- 2) S. Nishiguchi, M. Enomoto, S. Shiomi et al. : TT virus infection in patients with chronic liver disease of unknown etiology. *J. Med. Virology* 2000; 62:392-398
- 3) S. Nishiguchi, M. Enomoto, S. Shiomi, et al. GB virus C/hepatitis G virus and TT virus infections in Japanese patients with autoimmune hepatitis. *J. Med. Virology* 2002; 66: 258-262.

2. 学会発表

S. Nishiguchi et al. Location of antigenic epitopes of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) recognized by antibodies to liver kidney microsome (LKM)-1 in patients with autoimmune hepatitis-2 or chronic hepatitis C. The American Association for the Study of Liver Disease, October 2001, Dallas Texas.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

バイオインフォマティクスを用いた自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変の
肝組織中に発現する遺伝子の解析

分担研究者 小俣 政男 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：本研究は、対象とする難治性の慢性肝疾患（自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変）の病態解明、治療ターゲット遺伝子の探索および遺伝子発現プロフィールを用いた臨床診断、を目的としたものである。2,300既知遺伝子をスポットした in-house cDNA マイクロアレイを用いて自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変の網羅的な遺伝子発現解析を行った。正常肝組織に発現する遺伝子との比較により、それぞれの病態を反映すると考えられる遺伝子群の抽出が可能であった。自己免疫性肝炎と原発性胆汁性肝硬変では有意に発現の変動を認めた遺伝子は明らかに異なっており、両者には明瞭な病態の相違があり類縁の疾患ではないことが示唆された。またバイオインフォマティクスの手法を用いて選択した遺伝子セットを用いることにより、遺伝子発現プロフィールを用いた比較的信頼性の高い臨床診断が可能になると考えられる。

A. 研究目的

ヒトゲノムドラフト配列発表を契機に生命情報を包括的に解析検討し、生命現象および疾患の病態を解明しようとする試みがなされるようになってきた。DNAマイクロアレイ技術の登場により、大量の遺伝子発現情報が一度に得られるようになり、病態の違いによる網羅的な遺伝子発現プロフィールを検討することが可能になった。本研究ではマイクロアレイにより得られた情報を生命情報科学（バイオインフォマティクス）の手法を用いて処理し、自己免疫性肝炎（AIH）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）の病態の解明や今後の治療のターゲットの候補となる遺伝子の探索に関する検討を行った。

B. 研究方法

AIH、PBCの肝組織由来のRNAからpoly(A) mRNAを抽出し、cDNAに逆転写する際にCy-3蛍光色素にて標識した。また対照として正常肝組織より得られたmRNAより作製されたcDNAをCy-5蛍光色素にて標識した。これらを約2,300の既知遺伝子のcDNAをスポットしたガラスアレイに競合的にハイブリダイズさせ、2種の蛍光色素のシグナル強度の比を自動検出器にて測定し、遺伝子発現比とした。

正常肝に対するAIHおよびPBCの肝組織中での2,300遺伝子発現比を用い平均リンケージ法にて階層クラスタを描出した。AIH、PBCでそれぞれ共通して対照の正常肝組織に対する遺伝子発現比が2倍以上の遺伝子を発現亢進、1/2以下の発現比を示す遺伝子を発現低下として選択された遺伝子に関して検討を行った。またAIHとPBC間で発現の異なる遺伝子を探索するため、各遺伝子において10,000回のサンプル名の無作為入れ替えをベースにしたアルゴリズムにより有意にAIH、PBC間の発現比が異なる遺伝子を抽出した。また抽出法の信頼度を検討するため、サンプルの1つ抜き交差検定を行い最も信頼性の高い方法で

選択された遺伝子セットに残った遺伝子に関して検討を行った。解析アルゴリズムは以下の通りである。

```
1 begin initialize o=1,i=1,di,t,D,D'G
2 do o←o+1
3 do i←i+1
4 calculate di
5 D'←di
6 until i=10000
7 D←sort(D'), t=D[9990]
8 if (di>t), then G←di
9 until o=2300
10 return G
11 end
```

(筆者らの開発した解析プログラムは
<http://www.bioperl.org>からダウンロード可能。)

C. 研究結果

2,300遺伝子発現比を用いた平均リンケージ法による階層クラスタではAIHとPBCは明瞭に群別することが可能であった。AIHでは正常肝組織に比して発現の亢進および低下が認められたのはそれぞれ16遺伝子、3遺伝子であった。発現亢進が認められた遺伝子の内訳は転写因子(NF1B, BTEB1)、RNA修飾因子(PAPOLA, SFPQ)、核酸代謝(ADA)、アポトーシス阻害(IER3)、MAPK経路関連因子(MAPK1, MAP2K4, RAC3)、細胞内輸送(GOLGB1)、細胞間相互作用(ZYX)、胆汁分泌(CCK)、その他(GPM6B, MEF-2, TEB4, OSTF1)であった。発現低下が認められた遺伝子は炎症関連因子(C1S, ORM1)、細胞障害応答(FGA)であった。原発性胆汁性肝硬変において正常肝組織に比して発現の亢進および低下が認められたのはそれぞれ18遺伝子、3遺伝子であった。発現亢進が認められた遺伝子の内訳は免疫応答(HLA-DRB5, IFTTM2, IFTTM3, AHSB)、重金属結合蛋白

(MT1G, MT1L)、細胞骨格 (KRT8, KRT18, ACTA2)、アポトーシス阻害 (IER3)、細胞内輸送 (AP3B2, SLC25A3)、細胞間相互作用 (NK4)、アミノ酸代謝 (AGXT)、脂質代謝 (SAA1)、細胞増殖 (IGFBP5)、その他 (UGB, HRG) であった。発現低下が認められた遺伝子は脂質代謝 (FDPS)、胆汁産生 (AKR1C1)、転写因子 (TAF15) であった。AIHとPBCの比較においてLOOCVによる検討で最も2群の判別に有意に寄与する遺伝子はAIHで発現亢進が19遺伝子、発現低下が5遺伝子であった。PBCに比してAIHで亢進している遺伝子の内訳はRNA修飾 (SFRS5)、細胞内輸送 (XK, ABCB1, TM9SF2, SLC11A2)、核酸代謝 (ADA, PRPS2)、蛋白代謝 (CCS, FTHFD, PSMC2)、脂質代謝 (PXMP3)、細胞外基質 (DPT)、胆汁分泌 (CCK)、NOS阻害 (PIN)、その他 (SNTB1, ST13, GPM6B, THPO, DMRT2) であった。AIHで低下している遺伝子はRNA修飾 (HNRPA2B1)、蛋白代謝 (RPS29, BENE)、転写因子 (TAF10)、細胞内飲食 (ARF6) であった。選択された遺伝子を用いた階層クラスタでは2,300遺伝子を用いた場合に比し明らかに遠い距離にAIH群とPBC群をクラスタリングされた。

D. 考察

AIHとPBCの肝組織における遺伝子発現は大幅に異なっており、無作為に選択された2,300遺伝子によっても明瞭に判別が可能であった。AIHにおいては転写に関わる遺伝子が多く認められた。PBCにおいては免疫応答に関わるMHC分子等の発現亢進が認められた。また肝内胆汁鬱滞に伴う銅蓄積を反映していると思われるmetallothionein、Mallory小体を形成する中間径フィラメントであるkeratin、胆管周囲の繊維化を反映していると思われるactinの発現亢進が認められ、特にPBCにおいて病態を反映した遺伝子発現変化が認められた。AIHとPBCで唯一共通して発現の亢進が認められた遺伝子は immediate early response 3であり、免疫の関与した慢性肝疾患のkey moleculeである可能性は否定できない。AIHとPBCの比較においては、免疫応答や炎症に関わる遺伝子の発現差が認められなかったことと対照的に細胞内輸送や核酸、蛋白、脂質代謝に関わる遺伝子が多く認められた。これらの遺伝子は時系列で変動するALTや γ -GTPに代表される肝炎の活動度の指標とは独立して、AIHとPBCの恒常的な病態の相違を示している可能性がある。

E. 結論

In-houseのcDNAマイクロアレイを用いてAIHとPBCの遺伝子発現解析を行った。網羅的な遺伝子発現解析を行うことにより包括的な病態の解明、治療ターゲットの検討および遺伝子多型を検索する際の候補遺伝子の選定が可能になると考えられる。また適切に選択した遺伝子セットを用いることにより、遺伝子発現プロフィールを臨床診断に用いることも可能になると考えられる。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

自己免疫性肝炎における抗ミトコンドリア抗体検出の意義

研究協力者 三田村圭二 昭和大学医学部第二内科 教授

研究要旨：自己免疫性肝炎（AIH）における抗ミトコンドリア抗体（AMA）の意義を明らかにするため、AIH患者血清中のAMAを間接蛍光抗体法およびwestern blot法で検出し、その頻度と陽性例の臨床病理学的特徴を検討した。国際AIH診断基準で確診または疑診とされたAIH 55例を対象とした。AMAは間接蛍光抗体法で3例（5%）、western blot法で9例（16%）より検出された。AMA陽性AIHとAMA陰性AIHの間で、年齢、性、肝機能検査値、自己抗体、肝組織胆管障害所見ステロイド治療効果に差は認められなかった。今回のwestern blot法による解析では既報より高頻度にAIHにAMAが検出された。しかし、AMA陽性例と陰性例に臨床病理学差が認められないことより、AMA陽性AIHを必ずしもoverlap症候群と捉える必要はない。

共同研究者

柴田 実¹⁾、柳川達郎²⁾、川口直美³⁾、宮川 浩⁴⁾、石橋みゆき⁵⁾

1) 昭和大学医学部第二内科講師、2) 昭和大学医学部第二内科大学院、3) 帝京大学溝口病院中央実験室助手、4) 帝京大学医学部第四内科助教授、5) 帝京大学医学部第四内科教授

A. 研究目的

抗ミトコンドリア抗体(anti mitochondrial antibody: AMA)は原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis: PBC)の特異的診断指標である¹²⁾。しかし、AMAはPBC以外の疾患でも時に検出される^{3,4,5)}。AMAはまれには自己免疫性肝炎(autoimmune hepatitis: AIH)においても検出される^{6,7)}。我々はAIH患者におけるAMAの意義を明らかにするために、AIH患者血清中のAMAを間接蛍光抗体法(IF法)およびwestern blot法(WB法)で解析し、その頻度と陽性例の臨床病理学的特徴を明らかにした。

B. 研究方法

国際AIH診断基準⁸⁾で確診または疑診と診断されたAIH 55例を対象とし、以下の研究を実施した。1) 治療前の保存血清よりIF法によってAMAを測定した。2) ウシ心筋由来ミトコンドリア精製蛋白(BHM)を抗原とし、WB法でIgG、IgA、IgMクラスAMAを測定した。BHMはSchneiderらの方法を用いて精製した⁹⁾。なお、WB法で検出された抗体は、リコンビナントミトコンドリア蛋白を用いた抑制試験により、AMAであることを確認した¹⁰⁾。3) リコンビナントpyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2) 蛋白を抗原とし、WB法でIgG、IgA、IgMクラスAMAを測定した。リコンビナントPDC-E2蛋白はhuman placenta cDNA libraryからPDC-E2遺伝子領域(744-2202bp)を増幅し、pGEX2TH vector に挿入し、E.coli 内でGSTとのfusion proteinとして発現させ、精製後、

thrombin処理によってGSTと分離して作成した¹¹⁾。4) 各種測定系によるAMA陽性率の検討およびAMA陽性例と陰性例において、年齢、性差、国際AIHスコア、肝機能検査、各種自己抗体、肝組織所見、治療効果などの臨床病理学的特徴を比較した。

C. 研究結果

1) 対象の内訳

AIH症例数は55例であり、このうち32例が昭和大学医学部第二内科、23例が帝京大学溝口病院で診断された。年齢は平均55歳±3歳、年齢分布は21歳～72歳であった。性別は男性3例(5%)、女性52例(95%)であった。対象の国際AIHスコアは平均15.8±1.6であり、AIH確診例は21例、AIH疑診例は24例であった。HBs抗原は1例も検出されず、HCV抗体およびHCVRNAが5例(9%)で検出された。

2) AMAおよびその他の自己抗体

AMAはIF法で3例(5%)、BHMを抗原としたWB法で9例(16%)、リコンビナントPDC-E2蛋白を抗原としたWB法で9例(16%)より検出された。IF法でAMA陽性であった3例の抗体力価は2例が40倍、1例が160倍であった。AMA陽性の3例は全例WB法でもAMAが陽性であった。

WB法によるAMAの免疫グロブリン型はBHMを抗原とした解析ではIgG型7例、IgA型4例、IgM型9例、少なくとも1つの免疫グロブリン型のAMAが9例に検出された。リコンビナントPDC-E2蛋白を抗原とした検討ではIgG型6例、IgA型1例、IgM型8例、少なくとも1つの免疫グロブリン型のAMAが9例に検出された。BHMを用いたAMA陽性例とリコンビナントPDC-E2蛋白を用いたAMA陽性例は一致した。

その他の自己抗体は抗核抗体が55例(100%)、抗平滑筋抗体が26例(51%)、抗LKM1抗体が0例(0%)に検出された。

3) AMA陽性AIHとAMA陰性AIHの比較

WB法によるAMA陽性例とAMA陰性例で、年齢、

性差, AIHスコア, 肝機能検査 (T-Bil, ALT, ALP, IgG, IgA, IgM), 自己抗体(抗核抗体, 抗平滑筋抗体), 肝組織所見(胆管障害), ステロイド治療の著効率を比較した。両群間で全ての項目に有意差は認められなかった(表1)。

表1 AMA陽性AIHとAMA陰性AIHの比較

	AMA (western blot法)		P値
	陽性 (9)	陰性 (46)	
年齢	57±9	52±6	NS
男女比	0:9	3:43	NS
AIHスコア	15.7±1.6	15.9±1.7	NS
T-Bil	3.5±2.1	4.8±2.8	NS
ALT	510±24	403±22	NS
ALP	385±12	339±13	NS
IgG	3,519±35	2,877±29	NS
IgA	420±15	353±13	NS
IgM	432±16	329±17	NS
ANA	9 (100%)	46 (100%)	NS
ASMA	5 (56%)	23 (50%)	NS
肝組織			
胆管障害	4/8 (50%)	13/37 (35%)	NS
PSL治療			
投与	8/9 (89%)	36/46 (78%)	NS
著効	8/8 (100%)	34/36 (94%)	NS

D. 考察

AIHにおいて比較的高頻度にAMAが検出された。国際AIH診断基準で確定または疑診と診断されたAIH 55例中, IF法で3例(5%), WB法で9例(16%)にAMAが検出された。過去の報告ではAIHの5-10%にAMAが検出される³¹⁾³⁴⁾⁵¹⁶⁾¹⁷⁾。これらはIF法もしくはELISA法でAMAを測定したものである。今回用いたWB法によるAMA陽性率は16%と高い値であった。これはIF法とWB法の感度, 特異度の相違によると考えられる。IF法は簡便性, 経済性に優れるが感度が悪く, 偽陽性が多いため特異性に欠ける¹⁸⁾。IF法でAMA陰性のPBCにWB法を行うと, その90%でAMAが検出される¹⁹⁾。IF法でAMA陽性と診断されたAIHの27%は抗LKM1抗体をAMAと誤判定したための偽陽性であった²⁰⁾。AIHはWB法を実施すると高率にAMAが検出される。

今回の検討ではAMA陽性AIHとAMA陰性AIHとの間で臨床病理学的な差が認められなかった。AIHのおよそ7%は血清学的あるいは組織学的にPBCとのoverlapを示すが, その疾患概念ははまだ確立していない²¹⁾。Overlap症候群はいわゆる1型AIHに類似しステロイド治療に反応するという報告が存在する一方²²⁾, overlap症候群はPBCに類似しステロイド治療は無効とも報告されている²³⁾。今回の検討ではAMA陽性AIHにはPBCの存在を示唆する血液病理学所見が認められず, 全例ステロイド治療が著効であった。国際診断基準で確定あるいは疑診と診断されるAIHに出現するAMAは臨床的意義が乏しく, AMA陰性AIHと同様にステロイド治療が第一選択と考えられる。

E. 結論

AIH 55例におけるAMA陽性率はIF法5%, WB法16%であり, WB法を用いると従来の報告より高値であった。AMA陽性例と陰性例に臨床病理学的差が認められないことより, AMA陽性AIHを必ずしもoverlap症候群と捉える必要はない。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

2001,10,17 第5回日本肝臓学会大会

プレナリーセッション6, 自己免疫性肝炎におけるPDC-E2抗体検出の意義(Western blot法による検索): 1柳川達郎, 2川口直美, 1柴田 実, 2宮川浩, 2石橋みゆき, 1三田村圭二

1昭和大学医学部第二内科, 2帝京大学溝口病院・4内

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

文献

- Mackay IR. Primary biliary cirrhosis showing a high titer of autoantibody. *N Engl J Med* 1958; 258: 185-8.
- Walker JG, Doniach D, Roitt IM, Sherlock S. Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1965; 1: 827-31.
- Kenny RP, Czaja AJ, Ludwig J, Dickson ER. Frequency and significance of antimitochondrial antibodies in severe chronic active hepatitis. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 705-11.
- Zurgil N, Bakimer R, Moutsopoulos HM, et al. Antimitochondrial (pyruvate dehydrogenase) autoantibodies in autoimmune rheumatic diseases. *J Clin Immunol* 1992; 12: 201-9.
- Grimbert S, Johanet C, Bendjaballah F, Homberg J-C, Poupon R, Beaugrand M. Antimitochondrial antibodies in patients with chronic hepatitis C. *Liver* 1996; 16: 161-5.
- Czaja AJ. The variant forms of autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 588-98.
- Shibata M, Morizane T, Tanaka A et al: A case of autoimmune hepatitis with a high titer of antimitochondrial antibody and normal gamma-globulinemia. *J Gastroenterol Hepatol* 2001 Jul;16(7):830-835.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB et al: International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-

38.

- ⁹ Schneider WC, Hogeboom GH. Intracellular distribution of enzymes: further studies on the distribution of of cytochrome in rat liver homogenate. *J Biol Chem* 1950; 183: 123-8.
- ¹⁰ Miyakawa H, Kawaguchi N, Abe K, et al. Serial changes of serum anti-M2 proteins in patients with primary biliary cirrhosis: a follow-up study by immunoblotting. *Hepatol Res* 1999 ; 13: 143-52.
- ¹¹ Miyakawa H, Kawaguchi N, Kikuchi K, et al. Combination assays for IgG class and IgM class anti-pyruvate dehydrogenase complex (PDC)-E2 by ELISA using recombinant autoantigen to diagnose primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 1998; 12: 140-50.
- ¹² Czaja AJ, Carpenter HA, Manns MP. Antibodies to soluble liver antigen, P450IID6, and mitochondrial complexes in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105: 1522-8.
- ¹³ Zurgil N, Konikoff F, Bakimer R, Slor H, Shoenfeld Y. Detection of antimitochondrial antibodies: characterization by enzyme immunoassay and immunoblotting. *Autoimmunity* 1989; 4: 289-97.
- ¹⁴ Leung P, Coppel R, Ansari A, Munoz S, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 61-9.
- ¹⁵ Lohse AW, Meyer zum B_schenfelde K-H, Franz B, Kanzler S, Gerken G, Dienes H-P. Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatic form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 1999; 29: 1078-84.
- ¹⁶ Provenzano G, Diquattro O, Craxi A, et al. Immunoblotting as a confirmatory test for antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1993; 34: 544-8.
- ¹⁷ Bayraktar Y, Bayraktar M, Gurakar A, Hassanein TI, Van Thiel DH. A comparison of the prevalence of autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: the role of interferon in the development of autoimmune diseases. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 417-25.
- ¹⁸ 小野塚 靖, 米沢 仁, 磯部宣子: 各種自己抗体の意義と使い方. *Medicina* 1998; 35: 25-9.
- ¹⁹ Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K, et al. Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology* 2001; 34: 243-8.
- ²⁰ Czaja AJ, Manns MP, Homburger HA. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 103: 1290-5.
- ²¹ Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1998; 28: 360-5.
- ²² Davis PA, Leung P, Manns M et al: M4 and M9 antibodies in the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis: epitopes or epiphenomena? *Hepatology* 1992; 16: 1128-36.
- ²³ Chazouilleres O, Wendum D, Serfaty L, et al: Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. *Hepatology* 1998; 28: 296-301.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

急性型自己免疫性肝炎の臨床的研究

研究協力者 森實敏夫 神奈川歯科大学附属病院内科

研究要旨：自己免疫性肝炎111例を対象とし、クラスター分析により、血清総ビリルビン値3.0mg/dl以上かつ血清ALT正常上限10倍以上の症例を急性型、それ以外を慢性型自己免疫性肝炎と定義し、両者が同じ疾患であるという仮説を検定した。急性型は27例、慢性型は84例あり、両群間の背景因子、検査成績、肝組織所見、AIHスコア、治療効果および予後の相違を比較した。年齢（ 52.3 ± 14.2 歳と 52.8 ± 14.0 歳）、性別、自己免疫性疾患の合併率、自己抗体の陽性率、HLA DR 抗原の頻度、国際診断基準に基づくスコア、免疫抑制療法に対する応答、予後に差はなかった。臨床検査ではプロトロンビン時間、アルブミン、IgG正常上限値との比が急性型で有意に低値であり、ALPは有意に高値であった。病理組織では壊死炎症反応、肝細胞ロゼット形成、肝細胞虚脱、肝細胞多核化、胆汁うっ滞が急性型で有意に著明であった。以上より、急性型は肝細胞障害がより高度であるが、背景因子には差が無く、両者は同一の疾患と考えられた。

共同研究者

柴田 実¹⁾、内田俊和²⁾、中野雅行³⁾、小野塚 靖⁴⁾、高橋正一郎⁵⁾、稲垣恭孝⁶⁾、井上和明、与芝 真⁷⁾、上野幸久⁸⁾、三田村圭二¹⁾

- 1) 昭和大学第二内科、2) 昭和大学第二病理、3) 国立水戸病院病理、4) 川崎社会保険病院検査部、5) 富士吉田市立病院内科、6) 日本鋼管病院内科、7) 昭和大学藤が丘病院消化器内科、8) 三宿病院内科

A. 研究目的

自己免疫性肝炎autoimmune hepatitis（以下AIH）は慢性的疾患であるが、一部に発症時に急性肝炎としてとらえられる症例が存在する。急性肝炎様の発症形式をとるAIHが（以下急性型）が何らかの特別な因子により発症が規定されている可能性がある。

そこで、本研究では、急性型AIHとそれ以外の慢性型AIHが同一の疾患であるとの仮説を設定し、両群の背景因子、検査成績、肝組織所見、AIHスコア、治療効果および予後の相違を比較して、両者が異なる疾患単位かどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 対象および研究デザイン

対象はAIH 111例である。内訳は男性27例、女性84例、年齢は19歳から80歳で、平均（±標準偏差）は54（±14）歳であった。いずれも、AIH国際研究グループ¹⁾の診断基準による疑診および確診例である。

研究デザインはケース・コントロール研究であり、多施設共同研究である。

2) 統計学的方法

血清総ビリルビン値とALT値によるクラスター分析により、急性型を血清総ビリルビン値3.0mg/dl以

上かつ血清ALT正常上限10倍以上の症例、それ以外を慢性型自己免疫性肝炎と定義した（図1）。

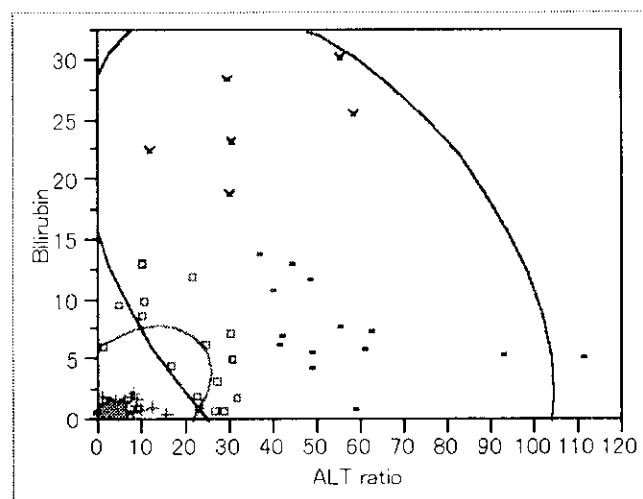


図1. 総ビリルビン値とALT値正常上限との比によるクラスター分析。総ビリルビン3mg/dl、ALT比10倍以上の症例を急性型AIHとした。

生存はKaplan-Meier法²⁾で解析し、2群間の連続変数はWilcoxon rank-sum test、名義変数は χ^2 乗法で解析した。

比較項目は、性、年齢、患者及び第一親等の自己免疫性疾患の合併、血清アルブミン値、ビリルビン値、プロトロンビン時間、ALT、ALP、IgG、抗核抗体、抗核抗体価、抗平滑筋抗体、抗平滑筋抗体価、抗ミトコンドリア抗体、抗ミトコンドリア抗体価、HLA DR4、DR2、肝組織所見および治療応答性（有無）である。

肝組織所見は壊死炎症反応、架橋壊死、虚脱、線維化、門脈周囲破壊、門脈域リンパ球反応、形質細胞浸

潤、胆管変性・胆管消失、肝細胞ロゼット形成、胆汁うっ滞、多核肝細胞について0~5または0~3にスコア化した。

統計解析はJMP 3.2.5 (SAS Institute Inc., NC, USA) を使用して行った。

C. 研究結果

1) 背景因子

急性型は27例、慢性型は84例であった。年齢(52.3±14.2歳と52.8±14.0歳)、性別、自己免疫性疾患の合併率には差がなかった。

自己抗体の陽性率、HLA DR抗原の頻度、国際診断基準に基づくスコア、免疫抑制療法に対する応答、予後にも差はなかった(図2)。

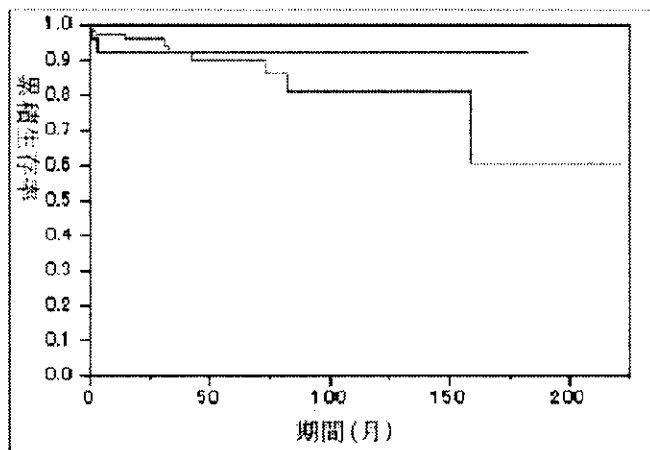


図2. 急性型AIHと慢性型AIHの累積生存率。Kaplan-Meier法。ログランク法でP=0.099。(緑の線が慢性型、茶色の線が急性型)。

2) 臨床検査成績

臨床検査ではプロトロンビン時間、アルブミン、IgGの正常上限との比が急性型で有意に低値であり、ALPは有意に高値であった。急性型の定義により、当然のことながら血清ビリルビン値とALT値は急性型で有意に高値であった(表1)。

表1. 急性型AIHと慢性型AIHの臨床検査所見

	急性型	慢性型	P値
PT (%)	73±23	86±19	0.0063
Platelet (10 ⁴ /μ)	30±50	25±38	0.0887
Albumin (g/dl)	3.6±0.6	3.9±0.6	0.0294
T-Bil (mg/dl)	11.5±8.0	1.1±1.5	<0.0001
ALT ratio	42±23	6±9	<0.0001
ALP ratio	1.6±0.7	1.3±0.9	0.0130
IgG (mg/dl)	2519±834	2851±936	0.0641
IgG ratio	1.3±0.6	1.6±0.6	0.0440

3) 病理組織

病理組織では壊死炎症反応、肝細胞ロゼット形成、肝細胞虚脱、肝細胞多核化、胆汁うっ滞が急性型で有意に著明であった。

D. 考察

本研究から、急性型AIHが特別なケア、治療を要する慢性型とは異なる疾患単位である可能性は否定された。コルチコステロイド投与を主とする免疫抑制療法の効果も同一であった。両者は同一の範疇の疾患であり、肝細胞障害の高度の例が急性型としてとらえられるていると思われる。

同じAIHでありながら、臨床的にとらえられる時点で異なる症状を呈する原因は現時点では不明である。発症以前から慢性の肝炎が持続していて、それが急性増悪した可能性や、初発時点で肝細胞障害が高度で急性肝炎を思わせる病態になった可能性が考えられる。いずれの場合も、高度の肝細胞障害の原因は明らかではない。

急性型では、肝細胞に対する自己免疫反応が強いことは想定されるが、なぜそうなるのかについては今後の研究が必要である。

肝硬変を伴うAIHの10年生存率は89%、肝硬変を伴わないAIHのそれは90%であることが報告³されている。また、中央値62歳のAIH患者を対象とした研究⁴では、5年生存率が64%と報告されている。わが国でも、3年生存率が90%という報告⁵がある。したがって、AIHの予後は良好というのが一般的な考え方である。今回、急性型の予後と慢性型の予後には差がなかった。急性発症型と慢性型を比較した報告⁶では、生存に差が認められておらず同じ結果であった。

AIH症例の大部分はコルチコステロイド^{7,8}、あるいはアザチオプリン⁹に反応し、肝機能の大幅な改善が得られる。わが国のAIH症例でもコルチコステロイドは90%の症例で有効である¹⁰。現時点では、劇症肝炎に発展するものを除き、急性型も慢性型も治療法は同じと考えてよいだろう。

E. 結論

- 1) 急性型自己免疫性肝炎と慢性型自己免疫性肝炎の背景因子には差がなく、予後にも差がない。
- 2) 臨床検査成績は急性型において肝細胞障害を反映する項目の異常の程度が有意に著明である。
- 3) 肝の病理組織像も急性型において肝細胞障害を反映する所見が有意に著明であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

第5回日本肝臓学会大会、シンポジウム10自己免

疫性肝炎の急性病変 (2001年10月18日、京都)
急性型自己免疫性肝炎(AIH)の臨床的検討
柴田 実¹, 森實敏夫², 三田村圭二³
1昭和大学医学部第二内科, 2神奈川歯科大学内科

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。

文献

- ¹ Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18: 998-1005
- ² Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.
- ³ Roberts SK, Therneau TM and Czaja AJ: Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1996; 110:848-57.
- ⁴ Parker DR and Kingham JG: Type 1 autoimmune hepatitis is primarily a disease of later life. *Qjm* 1997; 90:289-96.
- ⁵ Omagari K, Kinoshita H, Kato Y, Nakata K, Kanematsu T, Kusumoto Y, Mori I, Furukawa R, Tanioka H, Tajima H, Koga M, Yano M and Kohno S: Clinical features of 89 patients with autoimmune hepatitis in Nagasaki Prefecture, Japan. *J Gastroenterol* 1999; 34:221-6.
- ⁶ Nikias GA, Batts KP and Czaja AJ: The nature and prognostic implications of autoimmune hepatitis with an acute presentation. *J Hepatol* 1994; 21:866-71.
- ⁷ Krawitt EL: Autoimmune hepatitis [see comments]. *N Engl J Med* 1996; 334:897-903.
- ⁸ Czaja AJ: Drug therapy in the management of type 1 autoimmune hepatitis. *Drugs* 1999; 57: 49-68.
- ⁹ Johnson PJ, McFarlane IG and Williams R: Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis [see comments]. *N Engl J Med* 1995; 333:958-63.
- ¹⁰ Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuji T and Omata M: Present status of autoimmune hepatitis in Japan--correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26:1207-12.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

原発性胆汁性肝硬変(PBC)と劇症肝炎に関する臨床調査個人票の有用性の検討

研究協力者 森 満 札幌医科大学公衆衛生学 教授

研究要旨：特定疾患治療研究事業で医療費の公費負担を受けている原発性胆汁性肝硬変と劇症肝炎例の臨床調査個人票を有効に利用する方法を平成12年度に引き続き検討した。原発性胆汁性肝硬変では、抗ミトコンドリア抗体陰性例の特徴を調べた。劇症肝炎では、原因肝炎の性別、年齢階級別分布を調べた。これらのことにより、臨床調査個人票を用いれば疾患の基本的属性と特徴を多数例で検索でき、その有用性が明らかになった。

共同研究者

坂内文男 札幌医科大学公衆衛生学 助手

A. 研究目的

特定疾患治療研究事業の対象疾患は、臨床調査個人票に、毎年度、症例の基本的属性及び臨床所見等が記載されている。平成12年度に引き続き原発性胆汁性肝硬変と劇症肝炎の臨床調査個人票の有効利用法を検討してみた。

B. 研究方法

平成11年度に医療費の公費負担を受けた原発性胆汁性肝硬変患者6,527例と劇症肝炎296例の臨床調査個人票の情報をデータ化したファイルを用いた。登録された症例の内、原発性胆汁性肝硬変は、平成11年と平成12年3月までに臨床調査個人票が記載された5,805例、劇症肝炎は平成11年1月から平成12年3月までの間に発症した246例を集計した。原発性胆汁性肝硬変では抗ミトコンドリア抗体陰性例の集計、劇症肝炎では原因肝炎の性別、年齢別分布と、その他の集計を試みた。

(倫理面への配慮)

データファイルの管理は厳重に行い、解析時には、個人情報に関するデータは用いなかった。

C. 研究結果

[1] 原発性胆汁性肝硬変(PBC)

抗ミトコンドリア抗体(AMA)陰性症例の検討

1 男女別のAMA陰性率

男性55例/607例(9.1%)

女性682例/4,895例(13.9%)

カイ自乗検定 p=0.001

2 年齢階級別のAMA陰性率

男性(%) 女性(%)

10歳以下 2/3 (66.7) 4/5 (80.0)

11-20歳 3/5 (60.0) 11/34 (35.5)

21-30歳 3/22 (13.6) 24/161 (14.9)

31-40歳 11/91 (12.1) 102/893 (11.4)

41-50歳 11/154(7.1) 224/1,536(14.6)

51-60歳 16/220(7.3) 255/1,385(15.5)

61-70歳 8/103(7.8) 54/553 (9.8)

71歳以上 1/9 (11.1) 6/60 (10.0)

3 AMAと合併症

AMAの陽性陰性別に、PBCに合併しやすい自己免疫疾患の合併率を調べた。

(1) リウマチ性関節炎

陽性症例での合併率 304/4,765 6.4%

陰性症例での合併率 69/737 9.4%

カイ自乗検定 p=0.003

(2) シェーグレン症候群

陽性症例での合併率 536/4,765 11.2%

陰性症例での合併率 113/737 15.3%

カイ自乗検定 p=0.001

(3) 慢性甲状腺炎

陽性症例での合併率 201/4,765 4.2%

陰性症例での合併率 41/737 5.6%

カイ自乗検定 p=0.09

(4) 強皮症またはCREST症候群

陽性症例での合併率 90/4,765 1.9%

陰性症例での合併率 21/737 2.8%

カイ自乗検定 p=0.08

(5) 自己免疫性肝炎

陽性症例での合併率 34/4,765 0.7%

陰性症例での合併率 13/737 1.8%

カイ自乗検定 p=0.04

3 AMAと臨床検査成績

AMAの陽性陰性別に、臨床検査成績を比較した。

(1) 総ビリルビン(mg/dl)

	症例数	平均値	標準偏差	中央値
陽性	4,436	1.1	2.1	0.6
陰性	683	1.2	2.9	0.6

(2) アルカリフォスファターゼ

	症例数	平均値	標準偏差	中央値
陽性	4,658	481	487.8	369.5
陰性	716	509	1509.4	328

(3) γ -GTP

	症例数	平均値	標準偏差	中央値
陽性	4,643	167	237.6	90
陰性	715	146	286.5	65

(3) IgM(mg/dl)				
	症例数	平均値	標準偏差	中央値
陽性	3,732	468	409.3	375
陰性	602	307	265.6	239

[2] 劇症肝炎

1 肝炎の性別、年齢別分布

集計対象になった246例の内、昨年度に報告したウイルスが成因であった症例を選んだ。(1) A型肝炎7例(昨年度報告は6例であったが、その後7例であることが判明した)、(2) B型肝炎61例から新規症例44例を選び、B型肝炎ウイルス疑い1例とB型肝炎ウイルスマーカーは陰性でHCV陽性の2例を除いた41例、(3) C型肝炎7例の各肝炎について性別、年齢別分布を調べた。また、自己免疫性肝炎と「原因不明」の肝炎についても性別、年齢別分布を調べた。さらに、A型肝炎では発症季節、B型肝炎では急性肝炎と慢性肝炎からの移行を調べた。

(1) A型肝炎

年齢階級	症例数(%)	男性(%)	女性(%)
30～39歳	2(28.6)	0(0.0)	2(33.3)
40～49歳	1(14.3)	0(0.0)	1(16.7)
60～69歳	4(57.1)	1(100)	3(50.0)
計	7例	1例	6例

発症月	症例数(%)
1月	1例(14.2)
2月	2例(28.6)
3月	2例(28.6)
10月	2例(28.6)
計	7例

(2) B型肝炎

年齢階級	症例数(%)	男性(%)	女性(%)
20～29歳	5(12.2)	0(0.0)	5(45.5)
30～39歳	7(17.1)	6(20.0)	1(9.1)
40～49歳	7(17.1)	6(20.0)	1(9.1)
50～59歳	15(36.6)	13(43.3)	2(18.2)
60～69歳	5(12.2)	4(13.4)	1(9.1)
70歳以上	2(4.9)	1(3.3)	1(9.1)
計	41例	30例	11例

平均年齢 49.0歳 標準偏差 13.9

年齢中央値 50歳 男女比 1.4 : 1

上記症例41例中、急性肝炎 3例、慢性肝炎 2例、HBVキャリア3例が劇症肝炎の原因と臨床調査個人票に記載されていた。

(3) C型肝炎

年齢階級	症例数(%)	男性(%)	女性(%)
30～39歳	1(14.2)	0(0.0)	1(50.0)
50～59歳	3(42.9)	2(40.0)	1(50.0)
60～69歳	3(42.9)	3(60.0)	0(0.0)
計	7例	5例	2例

(4) 自己免疫性肝炎

年齢階級	症例数(%)	男性	女性(%)
20～29歳	1(14.2)	0	1(14.2)
50～59歳	3(42.9)	0	3(42.9)

70～69歳	3(42.9)	0	3(42.9)
計	7例	0例	7例

(5) 「原因不明」と記載された症例

年齢階級	症例数(%)	男性(%)	女性(%)
29歳以下	5(22.7)	4(28.6)	1(12.5)
30～39歳	1(4.5)	0(0.0)	1(12.5)
40～49歳	4(18.2)	3(21.4)	1(12.5)
50～59歳	7(31.8)	5(35.7)	2(25.0)
60～69歳	4(18.2)	2(14.3)	2(25.0)
70歳以上	1(4.5)	0(0.0)	1(12.5)
計	22例	14例	8例

D. 考察

1 原発性胆汁性肝硬変

抗ミトコンドリア抗体(AMA)陰性例の特徴として、陰性症例は男性より女性に多く、20歳以下に多いことが判明した。また、AMA陰性例は他の自己免疫疾患を合併しやすく、リウマチ性関節炎、シェーグレン症候群、自己免疫性肝炎では有意差がみられた。臨床検査成績ではIgMがAMA陰性例は陽性例より低値であった。これらの結果より、AMA陰性例は比較的若い年齢の女性で、他の自己免疫疾患を合併しやすいと推定できる。

2 劇症肝炎

A型肝炎では比較的高齢の60歳代からの発症があった。季節的には冬季にみられた。

B型肝炎は平均年齢が49.0歳であり50歳代からの発症が最多であった。C型肝炎は50歳代、60歳代からの発症がほとんどであった。A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎のいずれも50歳以降の発症が多くみられた。

また、自己免疫性肝炎も50歳以降の女性に多くみられた。以上の肝炎の年齢分布より50歳以降の肝炎には劇症化に対して十分な注意が必要であると思われる。また、「原因不明」の劇症肝炎は男女とも広い年齢層にみられ、今後の原因検索が重要となった。

E. 結論

臨床調査個人票は疾患の基本的属性と特徴を多数例より検索でき、その有用性が示された。

II-2. 原発性胆汁性肝硬変に関する研究

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

原発性胆汁性肝硬変に関する研究

分担研究者 大西 三朗 高知医科大学第一内科 教授

原発性胆汁性肝硬変（PBC）分科会の研究課題は①PBCの疫学調査、②病因・病態の解明、③新しい治療法の開発である。平成11-13年度においてはこれらの課題について以下に述べる研究を遂行し、一定の成果を得た。

疫学調査については平成13年度に第11回全国調査を行い、新規登録症例（平成11年1月～平成13年12月末）と経過観察症例の集計を進めている。経過観察3,034症例を診断時における臨床病期別（a-PBC 2,613例、s1-PBC 628例、s2-PBC 433）に生存率を解析すると、a-PBC例の約10%はs2-PBCに進展し、予後の不良な一群が存在する。無症候性PBCの予後の判別にはT-Bil, Al, T-Chol, 組織学的病期, UDCAの使用の有無が有用であった。一方、症候性PBCの一部は無症候性へ移行し予後は良好である。無症候性から症候性への移行率を過去20年間の観察期間中、前半の登録症例（1980～1989）と後半の登録症例（1991～2001）間で比較すると、累積移行率には差がないが、後半の登録症例では症候性に移行する期間が有意に延長していた。これには、本分科会の主導によるUDCA投与の普及が貢献していると考えられる。肝移植は23例に施行され、生存は19例である。家系調査では同胞内にPBC症例を有する11家系が報告されている。札幌医大公衆衛生から医療費の公費負担を受けている症候性PBC6,527例の臨床調査票に基づいて、AMA陰性症例は20才以下の症例に多い（約50%）事が報告された。

病因・病態については研究成果のまとめ6題が報告された。1）石橋研究協力者は胆管細胞破壊の標的抗原と想定されているPDH E-2のT cell epitopeの解析を行い、発症要因として大腸菌の感染を引き金に、molecular mimicryを介した自己反応性T細胞の活性化機構が関与し、さらにPDH E-2と内在性自己抗原である核膜抗原との間にもmolecular mimicryが見られる事を報告した。PBCに見られる免疫調節の異常について、2）恩地研究協力者から、樹状細胞（DC）の抗原提示機能の低下がallo MLRを用いて示され、その低下にはDCのNO産成の亢進が関与する事が報告された。また、PBCではDCの機能的亜分画であるDC2数の減少、IFN producing cellの増加する事も示された。

胆管上皮細胞については3）辻研究協力者は laser capture microdissection(LCM)法を用いてPBCの胆管上皮細胞を採取し、DNAマイクロアレイ法により、PBCで特異的に発現する幾つかの遺伝子を見いだした。また、PBCの胆管上皮には遊走因子でもあるstromal cell-derived factor-1 (SDF-1)の発現があり、

そのリセプター（CXCR4）を有する炎症細胞の遊走が病態に関与している可能性が示めされた。PBCでは肉芽腫形成が病理所見の特徴の一つであるが、4）中沼研究協力者は肉芽腫からPCRで検出される腸内細菌の中で、特にP.acnesの頻度が高く、また胆管上皮には自然免疫に関与するToll-like receptor (TLR) の発現していることが報告された。TLRの発現は主にリンパ球系細胞についての報告が多いが、上皮細胞のTLRは新しい視点である。5）向坂研究協力者は胆管上皮細胞間のtight junctionの形成に関与する種々の分子の発現を解析し、PBCではtight junctionの異常を介しての胆汁逆流が病態に関与する事を報告しているが、今回はseparate chamberを用いてbasolateral側にIFN- γ 、TNF- α を添加した時に、tight junctionの透過性が亢進する事を示した。6）市田研究協力者は肝移植時に肝リンパ球の亜分画をflow cytometryで解析し、NKT細胞分画がPBC stage Iでは低下し、stage IVでは健常肝と同じレベルに回復することを報告した。

PBCの動物モデルについて3題の成果が報告された。1）田中研究協力者から、マウスB6のMHC classII mutant（B6 x bml2）を用いたGVHRのモデルにanti-IL10投与を追加し、門脈域へのリンパ球浸潤面積の増大と、明瞭な胆管破壊像が認められることが報告された。2）小林研究協力者は胆管に強く発現するCK19のpromoterを用いてヒトPDC-E 2のtransgenic mouseを作成した。この系ではヒトPDHは自己抗原と認識されるので、胆管病変は起きない。いかにトランスを破壊させるかを検討中である。また、初代培養胆管上皮のヒトPDH transfectantも報告された。3）牧野研究協力者から、ConA肝炎モデルにおける好中球の肝細胞障害機序が詳細に解析され、GPT上昇にはケモカイン（MIP-2）を介した好中球の肝への浸潤が大きく関与し、この肝障害はAT-III投与により濃度依存的に阻止される事が報告された。

PBCに対する治療法の開発は本分科会の重要な課題である。すでに有用性が立証されているUDCAの他に、最近bezafibrate (BF) が有効との報告があり、その有効機序についても研究が行われている。大西分科会長からUDCA無効例に対するBF投与によるAlp低下作用と、BF長期投与例でのリンパ球浸潤と肝繊維化の改善例が提示された。BFの作用機序については、大西からPBCでは免疫組織学的にmulti-drug resistant 3 glycoprotein (MDR3) の低下が有り、BFの投与で回復する。また、廣原研究協力者からは胆管上皮細胞の培養系を用いて、BF添加によりMDR

3 のmRNAの発現増強が報告された。BFの作用機序についてはMDR 3を介する他に、恩地研究協力者から先述のDCによるNO産成亢進がBF投与により低下する事も報告された。

本分科会ではPBCにおけるBFの治療効果についての試験研究が進行中であり、進捗状況が報告された。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業） 分担研究報告書

PBCのベサフィブラート治療 — 長期投与例における検討 —

分担研究者 大西 三朗 高知医科大学第一内科 教授

研究要旨： bezafibrateの約4年の長期投与で非硬変PBCの症状消失、生化学的検査改善を認め、長期に肝胆道系酵素が正常値に維持されれば肝の組織学的改善も期待される。肝硬変症例では無効であり、肝移植後を含む組織学的早期症例で有効である。また、MDR3 glycoproteinの発現低下が未治療PBCで認められ、bezafibrate投与後に回復する。このことからMDR3 glycoproteinの発現低下がPBCの病態に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の治療にはウルソデオキシコール酸（UDCA）が主に用いられるが、その予後に対する効果は十分とは言えない。Bezafibrateは、遺伝性胆汁うっ滞症で変異が認められるMDR3遺伝子の転写を促進し、それを介してリン脂質の胆汁中への排泄を促すことで、細胞障害性胆汁酸の不活化作用を発揮しており、またPPARを介する様々な抗炎症作用を有する。本研究ではUDCA無効症例でのbezafibrateの有効性を臨床的に検討する。約4年間bezafibrateをUDCAに追加投与した8例の非硬変PBC例の経過を検討し、治療前PBC症例でのMDR3 P-glycoprotein (P-gp) の発現を免疫組織学的に検討し、その病態への関わりを検討した。

B. 研究方法

対象症例は非硬変PBC8例。UDCA投与（平均34ヶ月）でALP値が正常値の1.5倍以下に改善しなかった症例である。bezafibrateを追加、UDCAと併用投与を行った。bezafibrateは400mg/day経口投与、UDCAは600mgまたは900mg/dayで約4年間の経過を観察した。4例が症候性であった。3例は12,31,36ヶ月後に再度肝生検を施行した。また、生体肝移植後ALPの再上昇が認められた男性1例にbezafibrateを投与した。なお、すべての患者でインフォームドコンセントを得ている。

MDR3 P-gpの肝組織での発現を免疫組織学的に行った。対象は治療前PBC7例、Bezafibrate+UDCA投与31ヵ月後PBC1例、対照Chronic hepatitis C (F1/A1) 3例である。肝生検組織凍結切片を作製し、一次抗体にAnti-MDR-3 mAb (KAMIYA Biomedical) を用いABC法にてperoxidase発色で観察した。

C. 研究結果

8例で投与開始1年後においてALPは平均50%、 γ -GTPは平均38%と有意な低下を示した。bezafibrate投与前 γ -GTPが比較的高いF3症例ではALPはほぼ正常域に維持されたが、 γ -GTPに関しては十分な改善が得られずF4に進行した。その他はいずれの症例においても投与開始後2ヵ月で胆道系酵素は急速に低下

しその後はその値を約3年間にわたって維持していた。トランスアミナーゼも同様に有意に低下し、長期間低値を維持した。また、IgM値も投与前高値を示したものは胆道系酵素の低下にやや遅れて低下している。全身倦怠感あるいは掻痒感をともなった症候性患者4例では投与開始約2ヶ月で症状の消失が認められ、再発をみていない。組織学的所見は3例でbezafibrate投与開始12,31,36ヶ月後に施行されたが、門脈域の炎症の鎮静化とともに線維化の改善が認められた。これら症例では線維化のマーカーであるヒアルロン酸、IV型コラーゲン7Sドメインの低下が認められた。生体肝移植後ALPの上昇を認めた1例では、肝生検でPBC再発は明らかではなかったが、bezafibrateを投与しすみやかなALPの正常化を認めた。

MDR3 P-gpの肝組織での発現では、Chronic hepatitis C (F1/A1) に比較して未治療PBCではその発現低下が認められた。また組織学的改善が認められた治療後PBCでは対照とほぼ同等の発現が認められた。

D. 考察

長期にわたって、1. bezafibrateは症候性PBCの症状を消失させる。2. bezafibrateはUDCAで効果不十分なPBC症例において肝胆道系酵素を持続的に低下させる。3. 線維化の進行したPBCでは効果不十分か無効である。4. 生体肝移植後のALP上昇に有用である。5. bezafibrateによりIgM値の低下が認められ、免疫系への関与が示唆される。6. bezafibrateは安全に投与可能で、組織学的改善が期待される。MDR3 P-glycoproteinのmRNAの発現低下は認められず、タンパクレベルでの発現低下の原因は明らかではないが、それが増悪因子となっている可能性がある。

E. 結論

bezafibrateは非硬変PBCの症状、生化学的検査を、長期にわたって改善し、肝の組織学的改善ももたらすことが示唆された。MDR3 P-glycoproteinのPBC肝組織での発現低下が病態に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

Iwasaki S, Tsuda K, Ono M, et al; Bezafibrate may have a beneficial effect in pre-cirrhotic primary biliary cirrhosis. *Hepatology Research* 1999 ; 16 : 12-18.

岩崎信二、前田隆、大西三朗；原発性胆汁性肝硬変の病態と治療 Bezifibrateによる治療. *肝胆膵* 1999 ; 39 (1) : 103-110.

岩崎信二、前田隆、大西三朗；UDCA療法をめぐる Controversy Bezifibrate併用療法の機序. *肝胆膵* 2001 ; 43 (6) : 1057-1063.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

試験研究報告書

原発性胆汁性肝硬変(PBC)に対するベザフィブラート (BF) の臨床研究

分担研究者 大西 三朗 高知医科大学第一内科 教授

研究要旨：本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis : PBC) に対するベザフィブラート (bezafibrate : BF) の有効性及び安全性を評価することである。臨床研究IとしてPBCにおけるBF単独療法とウルソデオキコール酸 (ursodeoxycholic acid : UDCA) 単独療法の比較検討を、臨床研究 IIとしてUDCA治療患者におけるBF併用療法とBF非併用療法の比較検討を計画した。いずれも本研究班に所属する施設およびその関連施設43施設による多施設オープン試験（中央登録方式による無作為化2群比較試験）である。現在の登録状況は、17施設より臨床研究Iに19例、臨床研究IIに13例である（平成14年1月時点）。

A. 研究目的

PBCの内科的治療法で、長期投与における安全性と有用性が二重盲検試験によって立証されているのはUDCAのみであり、現在、PBCの第1選択剤として広く使用されている。しかし、その有用性には限界があり、無効例の存在や肝繊維化の進展を阻止できない場合がみられ、より効果の高い治療薬の出現が望まれている。

高脂血症治療薬であるBFは、fibrate系薬剤共通の作用として胆道系酵素を低下させることが以前より知られていた。最近、UDCA一次・二次無効PBC例に対してBFが肝・胆道系酵素異常を改善するという報告が散見されるようになった。今回、PBCに対するBFの有効性及びその安全性を評価するために、UDCAを対照薬とした無作為化2群比較試験を本研究班の共同研究として計画した。

B. 方法

1. 臨床研究 I : PBCにおけるBF単独療法とUDCA単独療法の比較検討（無作為化2群比較試験）

対象は厚生省「難治性の肝炎」調査研究班（1992年）の基準により診断され、血清ALP値が基準値上限の1.5倍以上を呈し、高脂血症を伴う、UDCA未治療のPBC症例（肝硬変また進行例は除外）である。症例は中央登録センターにおいて無作為にBF群（400mg/分2/日）とUDCA群（600mg/分3/日）の2群に割り付け、各々24週間投与を行う。投与開始前、投与4、12、24週後に肝・胆道系酵素、一般臨床検査、自他覚所見などの検査・観察を行い、可能な限り投与開始前、投与24週後に肝組織学的検査も実施する。目標症例数は70例（各群35例）、研究実施期間は平成12年12月から平成16年3月（最終登録は平成15年3月）である。

2. 臨床研究 II : UDCA治療患者におけるBF併用療法とBF非併用療法の比較検討（無作為化2群比較試験）

対象は厚生省「難治性の肝炎」調査研究班（1992年）の基準により診断され、UDCA600mg/日を登

録前26週以上投与しているにもかかわらず、血清ALP値が基準値上限の1.5倍以上を呈し、高脂血症を伴うPBC症例（肝硬変また進行例は除外）である。症例は中央登録センターにおいて無作為にBF併用群（UDCA600mg/分3/日+BF400mg/分2/日）とBF非併用群（UDCA600mg/分3/日）の2群に割り付け、各々52週間投与を行う。投与開始前、投与4、12、24、36、52週後に肝・胆道系酵素、一般臨床検査、自他覚所見などの検査・観察を行い、可能な限り投与開始前、投与52週後に肝組織学的検査も実施する。目標症例数は40例（各群20例）、研究実施期間は平成12年12月から平成16年3月（最終登録は平成14年9月）である。

C. 研究結果

本研究班に所属する班員・研究協力者のうち、本研究参加に同意された施設は43施設で、既に施設内審査委員会で承認され、試験開始されている施設は17施設である（平成14年1月時点）。

D. 考察および結論

BFはmultidrug resistant gene--3 (MDR3) を介して、肝細胞毛細胆管上のphospholipidの輸送タンパク(MDR3-p-glycoprotein)の発現を誘導し、胆汁中へのリン脂質の分泌を高進させ、疎水性胆汁酸をミセル化することで胆管細胞障害を軽減するとされている。また、BFはPPAR α (peroxisome proliferator activated receptor α)を介してNF- κ Bを抑制することで、免疫応答の調節や抗炎症作用を発揮すると考えられており、UDCAとは異なった作用機序の面からPBCの新しい治療薬として期待される。これまでの先駆的な報告では、肝・胆道系酵素のみならず、IgMの低下、自覚症状の改善にも有効であったとされるが、control studyではなく、小規模であること、組織学的検討が系統的になされていない点などの問題点がある。今回のrandomized prospective studyの研究成果が、PBCのBF治療に客観的な評価を与えるものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

(1) 原発性胆汁性肝硬変全国調査（第22報）

研究協力者 廣原 淳子 関西医科大学第三内科 助手

研究要旨：本研究の目的は、原発性胆汁性肝硬変（PBC）全国調査の長期追跡症例の検討により、本邦における無症候性PBC（a-PBC）の実態と変遷を明らかにすることにある。2001年12月末に実施した第11回PBC全国調査で、既登録症例995例と新規登録404例の報告が得られ、総登録症例は4765例となった（中間集計）。診断時a-PBCのうち、最終確認時においても発黄しなかった症例は観察期間中90%以上が生存していた。一方、診断時a-PBCからs2-PBCに進展した症例の平均生存期間は約10年であった。診断時a-PBCからs-PBCへの累積移行率の検討から、1989年以前の症例と比較して無症候の段階から症状発現までの期間延長が認められた。

共同研究者

仲野 俊成 関西医科大学 第三内科

A. 研究目的

本邦における原発性胆汁性肝硬変（PBC）の全国調査は1980年より実施され、その集計・解析は当初より継続して行なわれてきた。登録症例の長期予後解析の結果、診断时无症候性PBC（asymptomatic PBC：a-PBC）の大部分は長期にわたり発黄せず予後が良いが、予後不良な症候性PBC（symptomatic PBC）に進展する群が一部存在すること（本会第18報）、これらa-PBCの予後判別には診断時血清T-Bil、Alb、T-Chol、組織学的病期、UDCA使用の有無が有用であること（本会20報）をこれまでに報告した。今回は、2001年12月末に実施した第11回全国調査の中間集計結果を報告するとともに、a-PBCからs-PBCへの累積移行率について検討しa-PBCの病態の変化について第5回調査時の解析結果と比較した。

B. 方法

第11回PBC全国調査は、全国444の既登録施設に対し、1998年12月までの既登録症例の予後調査と1999年1月から2001年12月末までに新たに診断された新規症例についてアンケート調査により報告を求め、これら臨床像と予後について解析した。なお、最近の肝移植症例の増加に対応して移植後の予後追跡調査および各施設における家系例一次調査も同時に実施した。また、a-PBCからs-PBCへの移行率の検討では、第11回調査中間集計955例中、診断時a-PBCであった既登録症例757例のうち解析可能であった診断時a-PBC 579例（平均年齢54.8歳、平均観察期間95.7ヶ月）を対象として、診断時から経過中初めて搔痒感が発現した時点をs1-PBC移行時、初めてT-Bil2.0mg/dl以上を呈した時点をs2-PBC移行時としてKaplan-Meier法により解析した。同様に、第5回調査時（1989年12月

実施）のデータベースから解析可能であった診断時a-PBC780例（平均年齢54.6歳、平均観察期間39.8ヶ月）における結果と比較した。なお、研究対象とした登録症例の個人情報漏洩に関しては十分な配慮を行った。

C. 研究結果

1. 第11回PBC全国調査中間集計（2002年1月集計時）
 - 1) 登録症例数：これまでに寄せられた既登録追跡例は995例（回収率32.8%）、新規登録例は404例（年次別発生数：100-150例、診断時病期：a-PBC80%前後）であり、総登録例数は4765例であった。
 - 2) 予後：751例の死亡が確認され、肝不全と消化管出血が主な死因であることはこれまでの報告と変わらない。
 - 3) 診断時臨床病期別生存率：診断時a-PBC2636例、s1-PBC636例、s2-PBC437例について各々の5年生存率は98%、88%、55%、10年生存率は90%、70%、35%程度であり、各群相互間に $p < 0.00001$ 以下で有意差が認められた。
 - 4) 臨床病期の推移別生存率：診断時a-PBC2613例のうち、最終確認時においてa-PBCのままもしくはs1-PBCに進展した大部分の症例は、観察期間中90%以上が生存していた。一方、診断時a-PBCからs2-PBCに進展した群の平均生存期間は約10年であった。
2. 肝移植例の予後追跡調査（2002年1月集計時）：全国調査登録症例中1998年12月までに肝移植を施行された22例であり、予後が確認されたのは9例（生存7、死亡2：死因肝不全1、MOF1）、全例が生体部分肝移植であった。2001年12月までに新たに移植を受けた症例は15例（生存12、死亡2：死因感染症2、不明1）で、生体部分肝移植13、脳死肝移植1、ドミノ肝移植1例であった。